

10/524295

PCT/DEUS / 02 / 4 /

**BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND**

Rec'd PCT/PTO 11 FEB 2005

#2

PCT / DE03 / 02747



REC'D 10 OCT 2003	
WIPO	PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung**

**Aktenzeichen:** 102 38 433.9 "

**Anmeldetag:** 16. August 2002

**Anmelder/Inhaber:** Justus-Liebig-Universität Giessen, Giessen/DE

**Bezeichnung:** Verfahren zur Bestimmung des allelischen  
Zustandes am 5'-Ende des  $\alpha$ S1-Kaseingens

**IPC:** C 12 Q, A 01 K

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 15. September 2003  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

Waller

**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

A 9161  
08/00  
EDV-L



### Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft einen genetischen Marker am 5'-Ende  
des  $\alpha$ S1-Kaseingens (CSN1S1) und des Kaseingen-Komplexes und  
5 ein Verfahren zur alters- und laktationsunabhängigen Typisie-  
rung von Rindern durch Bestimmung des allelischen Zustands in  
diesem Bereich, sowie die Verwendung dieses Verfahrens zur  
Auswahl von Organismen mit einem bevorzugten Allel, bei-  
spielsweise in der markergestützten Selektion.

An.127/pri

## Patentanmeldung

Verfahren zur Bestimmung des allelischen Zustandes am 5'-Ende  
des  $\alpha$ S1-Kaseingens

5.

Die Erfindung betrifft einen genetischen Marker am 5'-Ende des  $\alpha$ S1-Kaseingens (CSN1S1) und des Kaseingen-Komplexes und ein Verfahren zur alters- und laktationsunabhängigen Typisierung von Rindern durch Bestimmung des allelischen Zustands in diesem Bereich, sowie die Verwendung dieses Verfahrens zur Auswahl von Organismen mit einem bevorzugten Allel, beispielsweise in der markergestützten Selektion.

10

An.127/Pri

### Stand der Technik

Das Vererbungspotential (im Hinblick auf den Milchproteingehalt und andere züchterisch relevante Merkmale) von Zuchttieren wird derzeit mittels der Zuchtwertschätzung anhand von Testpaarungen und Leistungserfassung der Nachkommen abgeschätzt. Der Nachteil dieses konventionellen Verfahrens ist offensichtlich, beim Rind vergehen zwischen der ersten Besamung mit einem Testbullen und dem Einsetzen der Laktation der ersten Töchter ca. 3 Jahre, bis zur Erfassung einer kompletten Laktation der Tochter also ca. 4 Jahre. Erst danach kann der Zuchtwert abgeschätzt werden. Bis dahin entstehen durch die Haltung der Bullen bis zum Vorliegen der ersten geschätzter Zuchtwerte und den Testpaarungen Kosten, die über diesen langen Zeitraum und in der Summe der Tiere erheblich sind. Für die Erfassung der Eigenleistung und Ermittlung eines Zuchtwertes bei Kühen gilt dies analog.

Daher werden seit einigen Jahren international Anstrengungen unternommen, mit Hilfe der Fortschritte in der Genomanalyse genetische Marker und direkte Gentests für züchterisch relevante Leistungsparameter zu entwickeln. Genomweite Markeranalysen haben dabei mit Hilfe der Kopplungsanalyse die Eingrenzung von Chromosomenbereichen, in denen leistungsbestimmende Genorte liegen - sogenannte QTL-Regionen (QTL = Quantitative Trait Loci) - ermöglicht. Derartige QTL-Studien und daraus resultierende Tests sind unter anderem in der WO 2000 36143 und der WO 2001 57250 A2/A3 beschrieben. Weitere Details der QTL-Analyse beim Nutztier und ein Verfahren, mit dem basierend auf QTL-Studien auch ursächliche Kandidatengene isoliert werden können beschreibt die DE 100 17 675 A1, deren Offenbarungsgehalt hier mit einbezogen wird.

Beim Rind und anderen zur Milchproduktion gezüchteten Spezies stellen die Milchmenge, Proteingehalte und Fettgehalte die entscheidenden Kriterien dar. Für diese Merkmale sind verschiedene QTL, unter anderem auf dem Chromosom BTA 6 identifiziert worden. Die potentiellen QTL-Regionen für Proteingehalte werden von verschiedenen Arbeitsgruppen relativ ein-

An.127/Pri

heitlich mit dem Bereich um oder zwischen den Mikrosatellitenmarkern *BM143* und *TGLA37* und damit rund 20-30 Centimorgan (cM) vom Kaseinlocus entfernt angegeben (Spelman et al. 1996, *Genetics* 144, 1799-1808; Georges et al. 1995, *Genetics* 139, 907-920; Kühn et al. 1996, *J Anim Breed Genet* 133, 355-362; Zhang et al. 1998, *Genetics* 149, 1959-1973). Nach Nadesalingam et al. (2001, *Mammalian Genome* 12, 27-31) sind allerdings die Kaseingene aufgrund ihrer Position (40cM entfernt vom QTL) als Kandidat für die beobachteten QTL-Effekte ebenfalls ausgeschlossen.

Bereits seit Mitte der 80er Jahre wurden auch die genetisch bedingten Milchproteinvarianten des Rindes im Hinblick auf einen Einfluss auf Milchmengen- und Milchqualitätsmerkmale untersucht. Dies erfolgte teils mittels Erfassung der phänotypisch (in der Milch) unterscheidbaren Proteinvarianten (Ng-Kwai-Hang et al., 1984, *J Dairy Sci* 67, 835-840 und Ng-Kwai-Hang et al., 1986, *J Dairy Sci* 69, 22-26.), später auch mittels molekulargenetischer Verfahren, die die den Proteinvarianten zugrundeliegenden genetischen Mutationen nachwiesen (Sabour et al., 1996, *J Dairy Sci* 79, 1050-1056). Die bisherigen Untersuchungen zeigen dabei teilweise widersprüchliche Effekte der untersuchten Varianten, die sich zwischen Rassen und regionalen Herkünften nicht immer bestätigen lassen (zusammengefasst bei Prinzenberg, 1998, ISBN 3-922306-68-3, Kap 2.4, S. 14-21). Die Mehrzahl dieser Untersuchungen konzentriert sich auf die Varianten des  $\beta$ -Laktoglobulins, des  $\beta$ - und  $\kappa$ -Kaseins, da im  $\alpha$ s1-Kasein nur zwei Proteinvarianten in nennenswerter Häufigkeit vorkommen und insbesondere in den bereits stark selektierten Milchrassen wie Holstein Friesian / Deutsche Holstein nahezu ausschliesslich die Proteinvariante  $\alpha$ s1-Kasein B zu finden ist (Ng-Kwai-Hang et al., 1990, *J Dairy Sci* 73, 3414-3420; Erhardt et al., 1993, *J Animal Breed Genet* 36, 145-152; Lien et al., 1999, *Animal Genetics* 30, 85-91). In einer neueren Untersuchung an Milchrindern mit unterschiedlichem Holstein Blutanteil (Freyer et al., 1999, *J*

An.127/Pri

*Animal Breed Genet* 116, 87-97) wurde  $\alpha$ s1-Kasein in den Kopplungsanalysen ebenfalls nicht verwendet, da keine ausreichende Variabilität vorhanden war.

Zur molekulargenetischen Differenzierung der  $\alpha$ s1-Kaseinvarianten B und C sind verschiedene Tests beschrieben (David & Deutch 1992, *Animal Genetics* 23, 425-429; Schlee & Rottmann 1992, *J. Anim Breed Genet* 109, 316-319). Für die seltenen Allele A, D und F existieren ebenfalls einzelne Gentestverfahren (Prinzenberg 1998, ISBN 3-922306-68-3; Kap 4.1, S 61-71), wie auch für den Nachweis einer quantitativen Variante  $\alpha$ s1-Kasein G (Mariani et al 1995, *L'industria del Latte* 31, 3-13). Schild & Geldermann (1996) zeigten mittels Sequenzierung von rund 1000 Basenpaaren (bp) aus dem 5'-Bereich des  $\alpha$ s1-Kaseingens bei verschiedenen Rinderrassen 17 variable Positionen im 5'-flankierenden Bereich des *CSN1S1* Gens, von denen 5 aufgrund variabler Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen mit Restriktfragmentlängenpolymorphismen (PCR-RFLP) nachweisbar waren. Nach Ehrmann et al. (1997, *J. Animal Breed Genet* 114, 121-132) sind die 5'-flankierenden Varianten jeweils mit bestimmten Proteinallelen gekoppelt, so dass von den vorhandenen Proteinvarianten auch auf bestimmte Varianten im 5'-flankierenden Bereich geschlossen werden kann. Einen Gentest zur Unterscheidung von  $\alpha$ s1-Kasein B und C bei Deutschen Schwarzbunten, Fleckvieh und Jersey-Kühen, welcher auf einem Fragment aus dem 5'-flankierenden Bereich des  $\alpha$ s1-Kaseingens basiert, beschrieben auch Koczan et al. (1993, *Animal Genetics* 24, 74). Für den letztgenannten Test wurde die strikte Kopplung mit den Proteinvarianten  $\alpha$ s1-Kasein B und C und damit die Gültigkeit für die Rassen Aberdeen Angus, Anatolisches Schwarzevieh, Angler, Asturian Valley, Ayrshire, British Frisian, Casta Navarra, Charolais, Chianina, Fighting Bull, Hereford, Jersey, Maremmana, Pezzata Rossa, Piemonteser, Scottish Highland, Türkisches Graues Sloppenrind inzwischen jedoch widerlegt (Jann et al., 2001, *Arch. Tierz, Dummerstorf* 45, 13-21).

An.127/Pri

Die Kaseingene sind als eng gekoppelter Genlocus beim Rind und beim Schaf auf Chromosom 6, beim Menschen auf Chromosom 4 und bei der Maus auf Chromosom 5 kartiert. Auch für andere Tierarten (Kaninchen, Schwein, Ziege) ist die Kopplung der Kaseingene nachgewiesen. Aufgrund dieser engen Kopplung, ist die derzeitige Angabe der Lokalisation des  $\alpha$ s1-Kaseingens in genetischen Karten beim Rind an die Lokalisation des  $\kappa$ -Kaseingens gebunden. Für beide Gene wird in der aktuellen Genkarte des Rindes die physische Position BTA6q31-33 und die genetische Position 82,6 cM (MARC97) bzw. 103,0 cM (IBRP97) angegeben. Die Rekombinationsrate zwischen  $\alpha$ s1-Kasein- und  $\kappa$ -Kaseingen wird damit als Null angenommen.

Die Nutzung einer Lactalbuminsequenz für die Auswahl von Zuchttieren ist in der EP0555435 offenbart. Für das bovine  $\kappa$ -Kasein existieren ebenfalls zahlreiche Genlests (Denicourt et al., 1990, *Animal Genetics* 21, 215-216; Medrano & Aguilar-Cordova, 1990, *Biotechnology* 8, 144-145; Finder et al., 1991, *Animal Genetics* 22, 11-20; Schlee & Rottmann, 1992, *J Animal Breed. Genet.* 109, 153-155; Zadworny & Kuhnlein, 1990, *Theor. Appl. Genet.* 80, 631-634), da diesem Protein Einflüsse auf die Verarbeitungseigenschaften und die Käseereignung der Milch zugeschrieben werden (siehe Lodes et al., 1996, *Milchwissenschaft* 51, 368-373 und 543-548).

Aufgrund der milchdrüsenspezifischen Expression werden die Promotoren der bovinen Milchproteingene und auch des  $\alpha$ s1-Kaseingens auch bei der Erstellung von transgenen Tieren und zur Expression in Zellkulturen genutzt. Die DE 38 54 555 T2, deren Offenbarungsgehalt hier mit einbezogen wird, beschreibt die Verwendung des  $\alpha$ s1-Kaseinpromotors und des Signalpeptids zur Produktion von rekombinanten Proteinen in der Milch von Säugetieren. Einen Überblick über die Nutzung von Transgenen Tieren zur Produktion von rekombinanten Proteinen und die dazu verwendeten Promotoren gibt auch Rudolph (1999, *Trends in Biotechnology (TIBTECH)* 17, 367-374).

An.127/Pri

Einen direkten Gentest für ein Gen aus dem Fettsäurestoffwechsel (DGAT1) beschreiben Winter et al. (2002, PNAS 99, 9300-9305) und schreiben diesem Gen einen Effekt auf den Milchfettgehalt zu.

5

Der Nachteil aller Verfahren, die basierend auf einer Milchprobe die genetischen Varianten phänotypisch (d.h. in Milchproben) differenzieren, besteht darin, dass nur laktierende Kühe untersucht werden können. Daher besteht der Bedarf, 10  
laktationsunabhängig die Tiere untersuchen zu können. Weiterhin stellen die im codierenden Bereich der Milchproteingene nachgewiesenen Polymorphismen nach derzeitigem Stand der Technik keine zuverlässigen Marker für Milchleistungsmerkmale dar. Die bisherigen QTL-Analysen weisen auf einen ausserhalb 15  
der Milchproteingene liegenden QTL hin.

Für  $\alpha$ s1-Kasein ist derzeit kein Marker mit ausreichender Variabilität vorhanden, so dass sich dieses Gen einer näheren Analyse von Effekten auf Milchleistungs- und Inhaltsstoffmerkmale weitgehend entzieht. Alle vorhandenen Testverfahren 20  
beruhen auf der molekulargenetischen Differenzierung der auch phänotypisch vorhandenen Variation.

Die Mikrosatellitenmarker, welche bei QTL-Analysen ermittelt wurden, eignen sich nur bedingt zum Einsatz in der markergestützten Selektion, da die jeweilige Marker-QTL-Kopplung 25  
zunächst geklärt werden muss. Es handelt sich bei diesen Mikrosatellitenmarkern jeweils um indirekte Tests, die je nach Dichte der Kopplung zum ursächlichen Genort eine reduzierte Aussagesicherheit haben.

Der Nachteil des Verfahrens der EP 0555435 besteht darin, 30  
dass  $\alpha$ -Lactalbumin nur einen geringen (ca. 2-5%) Anteil des gesamten Milcheiweiss ausmacht. Den größten Anteil stellen die Kaseine ( $\alpha$ s1-,  $\alpha$ s2-,  $\beta$ - und  $\kappa$ -Kasein) mit rund 80% am Gesamteiweiss dar. Daher ist bei Anwendung dieses Selektionsmarkers nur ein geringer züchterischer Fortschritt zu erwarten. 35

An.127/Pri



Der Gentest für DGAT1 von Winter et al. hat den Nachteil, dass aus Sicht der Züchter und der Milcherzeuger der Fettgehalt der Milch nicht das primäre Interesse genießt, sondern hinter dem Proteingehalt zweitrangig ist.

- 5 Der Nachteil des Verfahrens der DE 38 54 555 T2 besteht darin, dass der verwendete Anteil des  $\alpha$ s1-Kaseinpromotors nicht näher anhand einer Nukleotidsequenz charakterisiert ist. Es wird ein 9kb Fragment mit den Exons I und II, welches durch die Schnittstellen für KpnI und BamHI flankiert wird, verwendet. Es erfolgt keine Berücksichtigung der genauen Basenfolge oder von möglichen Variationen, die die Effektivität der Expression mit diesem Abschnitt des Promotors beeinflussen können.
- 10
- 15 Derzeit gibt es keinen zuverlässigen Marker für Milchprotein-gehalt und keinen direkten genetischen Test für einen funktionalen Genabschnitt, um Tiere alters- und laktationsunabhängig auf ihr genetisches Potential hin zu testen.

## 20 Aufgabe der Erfindung

Aufgabe der Erfindung ist es daher einen genetischen Marker und ein Verfahren zur Typisierung auf Milchleistungsmerkmale bereitzustellen, um Tiere alters- und laktationsunabhängig auf Milchleistungsmerkmale anhand ihres genetischen Materials zu untersuchen.

- 25 Die Lösung der Aufgabe erfolgt durch Bereitstellung eines auch in selektierten Milchrassen polymorphen genetischen Markers in der  $\alpha$ s1-Kaseinregion und eines Verfahrens, dass eine alters- und laktationsunabhängige Typisierung der Tiere,
- 30 die genetische Kartierung des  $\alpha$ s1-Kaseingens, die Untersuchung von eng an diesen Genort gekoppelten oder direkt dadurch hervorgerufenen Effekten und eine züchterische Nutzung ermöglicht.

An.127/Pri

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren handelt es sich um einen genetischen Test für einen funktionalen Genabschnitt, die Aussagesicherheit ist größer als bei gekoppelten Markern und das Test-Ergebnis liegt innerhalb weniger Tage bis hin zu 5 Stunden vor, wodurch die erheblichen Kosten der Testpaarungen reduziert werden können. Das erfindungsgemäße Verfahren beseitigt somit die beschriebenen Nachteile im Stand der Technik.

Mit dem erfindungsgemäßen Marker ist auch die Auswahl von besonders vorteilhaften Promotoren zur Erzeugung von Expressionsvektoren und transgenen Tieren möglich.

In einer besonders vorteilhaften Ausführungsform besteht die Erfindung aus einem Testkit, der die Oligonukleotide zur Anreicherung eines Teilbereiches der Markersequenz des  $\alpha$ s1-Kaseingens, vorzugsweise die Primer 1 CSN1S1pro1f (5' GAA TGA ATG AAC TAG TTA CC 3'), Primer 2 CSN1S1pro1r (5' GAA GAA GCA GCA ACC TGG 3') und Primer 3 CSN1S1pro2r (5' CCT TGA AAT ATT CTA CCA G 3') sowie Referenzproben für eine oder mehrere Sequenzen der Markersequenz des  $\alpha$ s1-Kaseingens und dessen 20 Allele enthält.

Folgende Abbildungen sind der Beschreibung beigelegt:

Abbildung 1 DNA-Sequenz aus dem 5'-flankierenden Bereich des  $\alpha$ s1-Kaseingens, im folgenden als Markersequenz bezeichnet. 25

Abbildung 2 Alignment der Nucleisäuresequenzen der allelischen Zustände des  $\alpha$ s1-Kaseingens Allel 1, Allel 2, Allel 3, Allel 4 (Unterschiede in potentiellen Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen sind hervorgehoben)

30 Abbildung 3 Schematische Darstellung der Wanderungsmuster der Allele 1 bis 4 des Markers CSN1S1 in der SSCP-Analyse.

Abbildung 4 Ergebnis der Varianzanalyse

An.12//Pri

- Überraschender weise wurde gefunden, dass der untersuchte Sequenzabschnitt, welcher durch die Oligonukleotide CSN1S1pro1f und CSN1S1pro1r bzw. CSN1S1pro2r begrenzt wird (grauer Kasten in Abbildung 1) innerhalb der Rasse Deutsch Holstein vier mittels einer Einzelstrang-Konformations-polymorphismen-Analyse detektierbare Allele aufweist und damit ausreichend polymorph ist, um eine genetische Kartierung und Analysen zum Effekt der Allele auf Milchleistungsparameter durchzuführen.
- Es handelt sich dabei um einen 1061 bp großen Abschnitt aus dem 5'-flankierenden Bereich und des Exon 1 (siehe Abbildung 1), im besonderen um den 654 bp großen Abschnitt, der durch die beiden Oligonukleotide CSN1S1pro1f und CSN1S1pro1r begrenzt wird.
- Die vier Allele wurden kloniert und sequenziert. Die Sequenzanalyse zeigt bis auf die Länge des poly-T (ab Position 390 der Abbildung 1) Übereinstimmung von Allel 2 mit der von Koczan et al. (1991, Nucleic Acids Research 19, 5591-56596; Genbank Acc. No. X59856) publizierten Sequenz. Die Allele 1, 3 und 4 unterscheiden sich durch verschiedene Substitutionen und Deletionen von dieser Sequenz. Die variablen Positionen sind im Sequenzalignment (Abbildung 2) hervorgehoben. In den Allelen 1 und 4 sind jeweils potentielle Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen durch Mutationen betroffen. Im Allel 1 fallen demnach zwei potentielle Bindungsstellen (für AP-1 und YY1) weg, wohingegen im Allel 4 eine potentielle ABF1-Bindungsstelle neu entsteht.
- Der gefundene Polymorphismus ist damit in einer vermutlich funktionalen Genregion lokalisiert und somit ein geeigneter Marker für Milchleistungsmerkmale, insbesondere für den Proteingehalt.
- Der Sequenzabschnitt wird mit folgenden erfindungsgemäßen Oligonukleotidsequenzen flankiert, die als Primer für die Amplifikation mittels PCR verwendet werden, wobei die Kombinationen Primer 1 mit Primer 2 und Primer 1 mit Primer 3 möglich sind:

An.127/Pri

Primer 1: CSN1S1pro1f (5' GAA TGA ATG AAC TAG TTA CC 3')

Primer 2: CSN1S1pro1r (5' GAA GAA GCA GCA AGC TGG 3')

Primer 3: CSN1S1pro2r (5' CCT TGA AAT ATT CTA CCA G 3')

- 5 Die Primerbindungsstellen sind in der Abbildung 1 grau unterlegt.

Es wird ein erfindungsgemäßes Verfahren bereitgestellt, das direkt am Erbmateriel des zu untersuchenden Organismus durchgeführt werden kann. Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Markers wird eine genetische Kartierung des  $\alpha$ s1-Kaseingens innerhalb der Kopplungskarte ermöglicht und die Ermittlung des alleli-  
 10 schen Zustands bei einzelnen Organismen, z.B. Rindern, vorgenommen, die innerhalb weniger Stunden das genetische Potential  
 15 al im Hinblick auf Milchproteingehalt ermittelt.

Das Verfahren zur Ermittlung des genetischen Potentials im Hinblick auf Milchproteingehalt durch Ermittlung des alleli-  
 schen Zustands des erfindungsgemäßen Markers besteht im Einzelnen aus:

- 20 1. Bereitstellung des genetischen Materials des zu untersuchenden Organismus, eines männlichen oder weiblichen Zuchtrindes oder eines Embryos.

Der Organismus ist dabei definitionsgemäß ein Tier, insbesondere ein Säugetier, im besonderen ein Rind, ein Schaf oder  
 25 eine Ziege einschließlich Embryonen dieser Spezies.

Der Organismus ist auch ein gentechnisch veränderter Organismus (GVO), welcher den beschriebenen Sequenzabschnitt aus dem  $\alpha$ s1-Kaseingen und das 5'-flankierenden Bereich (Abbildung 1) oder Teile dessen enthält.

- 30 Das genetische Material ist definitionsgemäß genomische DNS oder RNS von Tieren, aber auch Plasmid-DNS aus Bakterien, von artifiziellen Chromosomen wie BACs und YACs oder für spezielle Anwendungen erstellte Konstrukte aus genetischem Material

An.127/Uri

verschiedener Organismen, z.B. zur Herstellung von Transgenen.

Das Ausgangsmaterial zur Gewinnung von DNS- oder RNS-haltigem Material ist z.B. Blut, Leukozyten, Gewebe einschließlich Biopsiematerial, Milch, Sperma, Haare, einzelne Zellen einschließlich Zellmaterial aus Embryonen, eine Bakterienkultur oder auch isolierte Chromosomen. Weiterhin ist auch bereits zuvor amplifiziertes genetisches Material, welches die Markersequenz (Abbildung 1) oder Teile daraus enthält, erneut Ausgangsmaterial.

2. Gezielte Isolierung oder Anreicherung des Sequenzabschnitts der Abbildung 1 oder einer Sequenz, die Teilbereiche davon enthält, vorzugsweise den dargestellten Sequenzabschnitt Position 1 bis 654 der Abbildung 1.

Die Isolierung des genetischen Materials erfolgt nach Standardmethoden, wie sie z.B. im Handbuch „Molecular Cloning“ (Sambrook, Fritsch, Maniatis, 1989; Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York) beschrieben sind oder kann mittels kommerziell erhältlicher Kits (z.B. Nucleospin, Machery Nagel, Düren, Deutschland) durchgeführt werden.

Die Anreicherung erfolgt vorzugsweise mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR, Mullis & Falloona, 1987, *Methods in Enzymology* 155, 335-350), wobei auch fluoreszenzmarkierte, radioaktiv markierte oder chemisch markierte Primer eingesetzt werden können. Bei Verwendung von RNS als genetisches Material wird zweckmäßigerweise eine vorherige reverse Transkription (Myers & Gelfand 1991, *Biochemistry* 30, 7661-7666) durchgeführt.

Der Sequenzabschnitt wird vorzugsweise mit folgenden erfindungsgemäßen Oligonukleotidsequenzen als Primer für die Amplifikation angereichert, wobei die Kombinationen Primer 1 mit Primer 2 und Primer 1 mit Primer 3 möglich sind:

An. 127/Pri

Primer 1: CSN1S1prolf (5' GAA TGA ATG AAC TAG TTA CC 3')

Primer 2: CSN1S1prolr (5' GAA GAA GCA GCA AGC TGG 3')

Primer 3: CSN1S1pro2r (5' CCT TGA AAT ATT CTA CCA G 3')

Die Auswahl weiterer Primer, die die Amplifikation einer Teilsequenz der in Abbildung 1 beschriebenen Sequenz ermöglicht, innerhalb derer variable Nukleotidpositionen zur Unterscheidung der Allele 1 bis 4 liegen, ist ausdrücklich möglich.

3. Nachweis des allelischen Zustands im isolierten oder angereicherten Sequenzbereich der Abbildung 1, vorzugsweise innerhalb der Teilsequenz, die durch CSN1S1prolf und CSN1S1prolr begrenzt wird.

Zur Bestimmung des allelischen Zustands stehen eine Reihe von Standard-Techniken, die dem Fachmann bekannt sind, zur Verfügung, die Sequenzierung nach Sanger et al. 1977, durch Darstellung von Einzelstrang Konformationspolymorphismen (SSCP, Orita et al. 1989, *Genomics* 5, 874-879), mittels Restriktionsfragment Längenpolymorphismen (RFLP; Botstein et al. 1980, *American Journal of Human Genetics* 32, 314-331) und PCR-RFLP (Damiani et al. 1990, *Animal Genetics* 21, 107-114; Medrano & Aguilar-Cordova 1990, *Animal Biotechnology* 1, 73-77), allelspezifischer PCR (= ARMS, ASPCR, PASA; Newton et al. 1989, *Nucleic Acids Research* 17, 2503-2516; Sakar et al. 1990, *Analytical Biochemistry* 186, 64-68; David & Deutch 1992, *Animal Genetics* 23, 425-429), Oligonukleotid-Ligations-Test (= OLA; Beck et al. 2002, *J Clinical Mikrobiol* 40, 1413-1419), Temperaturgradienten Gel Elektrophorese (= TGGE, Tee et al. 1992, *Animal Genetics* 23, 431-435) und analoge, zum Stand der Technik gehörende Verfahren.

Es wird vorgeschlagen, die erfindungsgemäßen Primer mit einer Markierung (Fluoreszenz, Radioaktivität und ähnliches) zu versehen und die Bestimmung des allelischen Zustands am Sequenzierautomaten, durch Autoradiografie oder Chemilumineszenz durchzuführen. Bei Verwendung nicht-markierter Primer

An.127/Pri

erfolgt die Bestimmung des allelischen Zustands durch Darstellung der Fragmente nach Gelelektrophorese durch Färbung der Nukleinsäuren, z.B. mit Ethidiumbromid (Sambrook et al., 1989) oder im Silberfärbeverfahren (Bassam et al 1991, *Analytical Biochemistry* 196, 80-83).

Weiterhin ist es möglich, verschiedene Hochdurchsatzverfahren zum Mutationsnachweis, darunter die Verwendung von Oligonukleotid-Arrays (Dong et al 2001, *Genome Research* 11, 1418-1424), das TaqMan-Verfahren (Ranade et al 2001, *Genome research* 11, 1262-1268), Fluoreszenz-Polarisationsverfahren (Chen et al 1999, *Genome Research* 9, 492-498), Massenspektrometrische Verfahren (MALI-TOF; Sauer et al. 2002, *Nucleic Acids Research* 30, e22) einzusetzen. Diese Aufzählung ist beispielhaft und nicht limitierend zu verstehen.

Der allelische Zustand ist dabei als das Vorhandensein einer bestimmten Nukleotidsequenz innerhalb des angereicherten Bereiches zu verstehen. Abbildung 2 zeigt beispielhaft die Nukleinsäuresequenz von vier verschiedenen allelischen Zuständen des erfindungsgemäßen Markors (Abbildung 2, Allele 1, 2, 3 und 4).

Im Falle der Sequenzierung muss ein Vergleich mit den korrespondierenden Nukleotidsequenzen in Abbildung 2 1, 2, 3 und 4 erfolgen, um die zu Typ Allel 1 bis Allel 4 analogen Zuordnungen vorzunehmen. Basierend auf den angegebenen Nukleotidsequenzen ist es einer mit dem Stand der Technik vertrauten Person auch möglich, die Fragmentlängen bei einer PCR-RFLP Analyse zu bestimmen oder Oligonukleotide zum Nachweis über allelespezifische PCR zu konzipieren. Auch die Anpassung der weiteren zuvor genannten Techniken zum Mutationsnachweis ist dem Fachmann möglich.

Besonders vorteilhaft ist die Darstellung der allelischen Zustände mittels Einzelstrang-Konformationspolymorphismen (SSCP), da der allelische Zustand direkt anhand des Fragmentmusters abzulesen ist. Das Verfahren ermöglicht zusätzlich zur Detektion der hier beschriebenen 4 Allele auch die Erkennung

An.127/Pri

von weiteren, hier nicht beschriebenen Mutationen. Aus diesem Grund eignet es sich besonders gut auch zur Analyse des homologen Genombereiches bei anderen Tierarten als beim Rind. Um die Dauer der Gelelektrophorese zu reduzieren, ist die Verwendung eines kürzeren Fragmentes beispielsweise die in Abbildung 1 mit Pfeil markierte Sequenz, die durch die erfindungsgemäßen Oligonukleotide festgelegt wird, als der kompletten Sequenz empfehlenswert.

Abbildung 4 zeigt eine schematische Darstellung der Allele 1 bis 4 des Markers CSN1S1 in der SSCP-Analyse im 12%igen Acrylamid:Bisacrylamid 49:1 Gel mit 1% Glycerolzusatz. Die Felder 1 bis 4 repräsentieren die vier verschiedenen Auftrennungsmuster der Allele. Die Wanderungsrichtung der Moleküle im elektrischen Feld von Kathode (-) zur Anode (+) ist mit einem Pfeil dargestellt. Die Einzelstränge der Allele zeigen ein typisches, deutlich voneinander verschiedenes Auftrennungsmuster. Da mittels Silberfärbung beide DNS-Einzelstränge dargestellt werden, ist jedes Allele durch zwei Banden charakterisiert.

4. Auswahl von Organismen, die den jeweils vorteilhaften allelischen Zustand des erfindungsgemäßen Markers tragen. Dies kann z.B. der allelische Zustand 1 oder 4 sein, welcher sich von Allel 2 durch die Anzahl der potentiellen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren unterscheidet.

An.127/Pri



### Ausführungsbeispiele

1. Verfahren zur Typisierung auf Milchleistungsmerkmale durch  
5 Ermittlung des allelischen Zustands des erfindungsgemäßen Markers

Als Ausgangsmaterial wird Rinderblut verwendet. Die Isolierung des genetischen Materials (genomische DNS) erfolgt nach der Hochsalzmethode von Montgomery & Sise (1990, NZ J. Agric  
10 Res 33, 437-441).

Für die Durchführung der Amplifizierung des Markers mittels PCR-Reaktion werden die erfindungsgemäßen Oligonukleotidsequenzen als Primer verwendet:

Primer 1 CSN1S1prolf (5' GAA TGA ATG AAC TAG TTA CC 3')

- 15 Primer 2 CSN1S1prolr (5' GAA GAA GCA GCA AGC TGG 3')

Die Reaktionsansätze enthalten in 15µl jeweils 20-100 ng zu testende genomische DNS, 10pmol jedes Oligonukleotids CSN1S1prolf und CSN1S1prolr, 0,5 U Taq-DNA-Polymerase (Peglab Biotechnologie, Erlangen), 50 µM dNTPs in einem Standardpuffer (10mM Tris-HCl pH 8,8, 50 mM KCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>). Das  
20 Temperaturprogramm (in einem Thermocycler Modell iCycler der Firma Biorad) wird wie folgt gewählt: 1 min. - 93°C (1x), (40 sec - 91°C, 40 sec. 57°C, 40 sec - 70°C) (30x) und 3 min - 70°C (1x). Danach erfolgte die Kühlung auf 4°C.

- 25 Jedem Reaktionsansatz werden anschliessend je 25µl eines Formamid-Denaturierungspuffers zugegeben (95% Formamid, 0,025% (w/v) Bromphenolblau, 0,025% (w/v) Xylencyanol (FF), 20 mM EDTA), die Mischung für 2 min bei 93°C erhitzt, in Eiswasser abgekühlt und je 4µl der Mischung auf ein 12%iges  
30 49:1 Acrylamid-Bisacrylamidgel mit 1% Glycerolzusatz geladen. Die Auftrennung erfolgt über 20h bei 420V und 10°C in einer Vertikalelektrophoresekammer Modell Pengiun P9DS (OWL Scientific, Woburn, USA) mit einem 0,8 mm dünnen 16x16cm großen gel. Als Lauf- und Gelpuffer wurde 0,5x TBE verwendet. Nach

An.127/Pri

der Elektrophorese wurden die Gele mit Silbernitrat nach dem Protokoll von Bassam et al. (1990, *Analytical Biochemistry* 196, 80-83) gefärbt. Die Entwicklungsreaktion wurde durch Überführen der Gele in eiskalte 0,04M EDTA-Lösung gestoppt.

- 5 Das Wanderungsmuster der Allele 1 bis 4 zeigt schematisch Abbildung 3. Da mittels Silberfärbung beide (codierender und nicht-codierender DNS-Strang) angefärbt werden, sind jeweils zwei Fragmente pro Allel vorhanden.

## 10 2. Darstellung der Variabilität der Markers CSN1S1 bei verschiedenen Rinderrassen

- Aus DNS von 83 Rindern der Rassen Deutsche Schwarzbunte (6 Rinder), Deutsches Rotvieh (4 Rinder), Gelbvieh (7 Rinder), Deutsch Holstein (18 Rinder), Fleckvieh (9 Rinder), Jersey (13 Rinder), Pinzgauer (20 Rinder) und Simbrah (6 Rinder) wird mit den erfindungsgemäßen Oligonukleotiden CSN1S1prolf (5' GAA TGA ATG AAC TAG TTA CC 3') und CSN1S1prolr (5' GAA GAA GCA GCA AGC TCG 3') die in Abbildung 1 dargestellte Nukleinsäuresequenz Position 1 bis 655 mittels PCR amplifiziert. Das weitere Vorgehen erfolgt wie unter Beispiel 1 beschrieben.
- 20

In den untersuchten Rassen tauchen die typischen, wie in Abbildung 3 gezeigten Auftrennungsmuster auf.

25

## 3. Darstellung der Variabilität der Markers CSN1S1 innerhalb der Rasse Deutsch Holstein

- Aus Blutproben von 503 Kühen der Rasse Deutsch Holstein wird DNA nach der Methode von Montgomery & Sise (1990, *NZ J Agric Res* 33, 437-441) isoliert. Die Anreicherung der in Abbildung 2 dargestellten Sequenz erfolgt mit den erfindungsgemäßen Primers, wie oben beschrieben, die Darstellung der vorhandenen Variationen erfolgt mittels SSCP-Technik. Bei den unter-
- 30

An.127/Pri

suchten Kühen dieser Rasse sind alle ebenfalls vier Allele nachweisbar. Folgende Allelfrequenzen wurden bestimmt:

Allel 1 - 0,031	Allel 2 - 0,739
Allel 3 - 0,194	Allel 4 - 0,036

5

Das Allel 2 stellt damit das häufigste Allel in Rasse Deutsch Holstein dar, gefolgt von Allel 3 und den zwei seltenen Allelen 1 und 4.

Die Genotypen traten in der Häufigkeit 22 > 23 > 24 > 12 > 33 > 34 auf. Die Genotypen 11 und 14 sowie die Kombination dieser zwei seltenen Allele (Genotyp 14) werden nicht gefunden.

#### 4. Genetische Kartierung des Markers CSN1S1

Mittels des erfindungsgemäßen Verfahren mit dem Marker CSN1S1 werden acht Halbgeschwisterfamilien der Rassen Deutsch Holstein (7) und Fleckvieh (1) typisiert und mit den Ergebnissen von Thomsen et al. 2000 (*J Anim Breed Genet* 117, 289-306) verglichen, der diese Familien bereits für 10 weitere Marker auf BTA 6 (Mikrosatellitenmarker) typisiert und eine Kopplungskarte erstellt hat. Die Typisierungsdaten für CSN1S1 werden in diesen bestehenden Datensatz integriert. Die Kartierung unter Verwendung der Funktion BUILD des Programmpaketes CRI-MAP (Version 2.4; Green et al. 1990, Documentation of CRI-MAP, Washington School of Medicine, St. Louis, MO, USA) führt zu zwei möglichen Positionen des Markers CSN1S1: zwischen den Markern IL97 und FBN14 oder FBN14 und CSN3. Die weiterhin durchgeführte FLIPS-Analyse führt zur endgültigen Kartierung von CSN1S1 zwischen den Markern FBN14 und CSN3.

Die Gesamtlänge der mit den 11 Markern berechneten Kopplungskarte von BTA6 beträgt 161.1 cM. Die Position aller in die Kopplungskarte einbezogenen Marker und die vergleichenden Angaben aus den vorhandenen Genkarten MARC97 und IBRP97 zeigt die folgenden Tabelle 1. Dargestellt sind die Marker zur

An.127/Pri

Erstellung der Kopplungskarte von BTA6, die Anzahl der informativen Meiosen und mit CRI-MAP berechnete Positionen (cM) auf der genetischen Karte (die erfindungsgemäße Karte ist mit „ADR“ bezeichnet) im Vergleich zu den beiden veröffentlichten Genkarten MARC97 und IBRP97. Für die mit n.a. eingetragenen Marker ist keine Kartierung in den jeweiligen Genkarten angegeben.

Marker	Informative	Position (cM)		
		ADR	MARC97	IBRP97
ILSTS93	193	0.0	0.0	16.0
ILSTS90	156	28.5	11.8	0.0
BM1329	141	56.8	35.5	45.0
URB16	228	57.9	n.a.	40.0
DIK82	356	78.5	n.a.	67.0
ILSTS097	78	99.6	67.2	89.0
FBN14	187	104.1	n.a.	n.a.
CSN1S1	280	108.1	(wie CSN3)	(wie CSN3)
CSN3	102	113.5	82.6	103.0
BP7	208	123.6	91.2	n.a.
BMC4203	186	161.1	112.9	n.a.

Tabelle 1

10

##### 5. Varianzanalyse zur Schätzung von Effekten auf Milchleistungsmerkmale

Mittels des erfindungsgemäßen Verfahren werden insgesamt 729 Bullen aus 9 Halbgeschwisterfamilien der Rassen Deutsch Holstein und Simmental mit dem Marker CSN1S1 typisiert. Die Verteilung der Genotypen in den 9 Halbgeschwisterfamilien zeigt Tabelle 2.

20

An.127/Pri

Familie	n	CSN1S1 Genotyp							
		12	13	14	22	23	24	33	34
1	19	-	-	-	9	10	-	-	-
2	108	48	5	5	37	9	4	-	-
3	106	4	-	3	40	10	37	-	12
4	27	12	3	2	-	10	-	-	-
5	12	-	1	-	5	5	-	1	-
6	27	-	-	-	9	16	1	1	-
7	55	1	-	1	22	4	23	-	4
8	56	4	2	-	26	17	3	1	3
9	319	10	-	-	250	50	9	-	-
total	729	79	11	11	398	131	77	3	19

Tabelle 2

Die Zuchtwerte der Bullen werden zentral durch die Vereinigten Informationssysteme Tierhaltung (VIT) in Verden geschätzt. Insgesamt gehen über 150.000 Töchter und deren Leistungsdaten in die Zuchtwertschätzung ein. Von allen Bullen werden deregressierte Zuchtwerte für die Milchmenge, Protein- und Fettmenge, Proteingehalt (in %) und Fettgehalt (in %) in der Varianzkomponentenschätzung verwendet. Die Deregression der Zuchtwerte erfolgt wie bei Thomsen et al. (2001, *J Anim Breed Genet.* 118, 357-370) beschrieben.

Die Varianzkomponentenschätzung wird mit dem Programmpaket SAS durchgeführt. Als einziger fixer Effekt wird zunächst der Marker CSN1S1 im Modell berücksichtigt, da andere Einflussfaktoren (z.B. Betriebseffekte, Melkhäufigkeit) bereits im Rahmen der Zuchtwertschätzung und durch die Deregression (Einfluss der Väter) korrigiert werden. Die Analyse ergibt signifikante Effekte des Markers CSN1S1 auf alle untersuchten Merkmale (deregressierte Zuchtwerte für Proteingehalt (DRG\_PP), Milchmenge (DRG\_MY1), Fettmenge (DRG\_FY1), Proteinmenge (DRG\_PY1), Fettgehalt (DRG\_FP)). Tabelle 3 zeigt den Effekt von CSN1S1 auf deregressierte Zuchtwerte für Milchleistungsmerkmale mit Angabe der Irrtumswahrscheinlichkeiten (p) für die Effekte auf die Einzelmerkmale.

An.127/Pri

Merkmal	Irrtumswahrscheinlichkeit (p)
DRG_PP	< 0.0001
DRG_MY1	0.0011
DRG_FY1	0.0016
DRG_PY1	0.0056
DRG_FP	0.0052

Tabelle 3

Die höchste Signifikanz wird für den Effekt auf DRG\_PP berechnet. Da der untersuchte Marker CSN1S1 direkt im regulatorischen Bereich eines Milchproteingens liegt, könnte dies ein Hinweis auf einen direkten Effekt sein. Der Marker CSN1S1 erfüllt die Anforderungen an ein funktionelles Kandidatengen.

Die höchsten Zuchtwerte für Milchmenge (DRG\_MY1) erzielen im Mittel Bullen mit dem Genoty 12, wohingegen die höchsten Zuchtwerte für Proteingehalte (DRG\_PP) in der Gruppe mit Genotyp 24 gefunden werden. Eine Zusammenstellung der Least square Mittelwerte (LS\_means) für die Gruppen mit den Genotypen 12, 22, 23, und 24 zeigt Tabelle 4. Dargestellt sind die LS\_means sowie Standardfehler für die deregressierten Zuchtwerte für Milchmenge (DRG\_MY1) und Proteingehalt (DRG\_PP) in Gruppen mit verschiedenen CSN1S1 Genotypen.

CSN1S1 type		LSMEAN ± se	
	n	DRG_MY1	DRG_PP
12	79	198.232 ± 15.700	- 0.00022534 ± 0.00006470
22	398	155.341 ± 6.995	- 0.00037495 ± 0.00002921
23	131	138.806 ± 12.192	- 0.00038405 ± 0.00005271
24	76	112.364 ± 16.007	0.00008175 ± 0.00006650
alle	684	152.353	-0.000307

Tabelle 4

An.127/Pri

Zur genaueren Abklärung wird die Varianzanalyse innerhalb einzelner Familien und Gruppen von Familien mit denselben Genotypen erneut durchgeführt. Dabei zeigt sich, dass der Effekt auf die Milchmenge nicht in allen Familien bestätigt werden kann. In Familie 9, in welcher vom Vater ausschliesslich das Allele 2 vererbt wird, ist der einzige verbleibende Effekt in der Nähe der 5% Signifikanzschwelle für DRG\_PP zu finden ( $p = 0.0610$ ). Weiterhin wird für alle Genotypgruppen und einzelne Familien ein Vergleich der LS-means für die Merkmale DRG\_MY1, DRG\_PP, DRG\_FP durchgeführt und die Differenz der LS-means für die Genotypen 12, 23 und 24 zum häufigsten Genotyp 22 auf Signifikanz geprüft. Die Ergebnisse sind grafisch dargestellt in Abbildung 5.

An.127/Pri

# Ansprüche

1. Genetischer Marker am 5'-Ende des  $\alpha$ sl-Kaseingens dadurch gekennzeichnet dass er die Nukleotidsequenz 1 - 1061, bevorzugt die Nukleotidsequenz 1 - 655 am 5'-Ende des  $\alpha$ sl-Kaseingens beinhaltet.
2. Genetischer Marker gemäß Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet dass er durch die  
 Primer 1 CSN1S1pro1f (5' GAA TGA ATG AAC TAG TTA CC 3')  
 Primer 2 CSN1S1pro1r (5' GAA GAA GCA GCA AGC TGG 3')  
 oder durch die  
 Primer 1 CSN1S1pro1f (5' GAA TGA ATG AAC TAG TTA CC 3')  
 Primer 3 CSN1S1pro2r (5' CCT TGA AAT ATT CTA CCA G 3')  
 in der PCR-Reaktion amplifiziert wird.
3. Genetischer Marker gemäß Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet dass er innerhalb von Milchrassen variabel ist.
4. Genetischer Marker gemäß Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet dass er zur Bestimmung des allelischen Zustandes am 5'-Ende des  $\alpha$ sl-Kaseingens verwendet wird.
5. Verfahren zur Ermittlung des allelischen Zustands des 5'-Ende des  $\alpha$ sl-Kaseingens, gekennzeichnet durch die folgenden Schritte,
  - a) Bereitstellen des Ausgangsmaterials des zu untersuchenden Organismus
  - b) Isolierung des genetischen Materials
  - c) Gezielte Isolierung oder Anreicherung des Markerabschnittes des 5'-Bereiches  $\alpha$ sl-Kaseingens oder einer Sequenz, die Teilbereiche des Markerabschnittes, vorzugsweise den Abschnitt 1 bis 655 der Markersequenz aus dem  $\alpha$ sl-Kaseingen enthält

An.127/Pri



zugsweise den Abschnitt 1 bis 655 der Markersequenz aus dem  $\alpha$ sl-Kaseingen enthält

- 5 d) Nachweis des allelischen Zustands im isolierten oder angereicherten Sequenzbereich des Markerabschnitts des  $\alpha$ sl-Kaseingens.
- 10 1. Verfahren gemäß Anspruch 5, gekennzeichnet dadurch das das Ausgangsmaterial aus einem Tier, insbesondere einem Säugetier, im besonderen einem Rind, einem Schaf oder einer Ziege einschließlich Züchttieren und Embryonen dieser Spezies stammt.
- 15 2. Verfahren gemäß Anspruch 5, gekennzeichnet dadurch das das Ausgangsmaterial Blut, Leukozyten, Gewebe einschließlich Biopsiematerial, Milch, Sperma, Haare, einzelne Zellen einschließlich Zellmaterial aus Embryonen, eine Bakterienkultur oder auch isolierte Chromosomen ist.
- 20 3. Verfahren gemäß Anspruch 5, gekennzeichnet dadurch das das Ausgangsmaterial aus einem gentechnisch veränderten Organismus (GVO) stammt, der den Markerabschnitt des  $\alpha$ sl-Kaseingens enthält.
- 25 4. Verfahren gemäß Anspruch 5, gekennzeichnet dadurch das das genetische Material genomische DNA oder RNA von Tieren, Plasmid-DNA aus Bakterien, von artifiziellen Chromosomen wie BACs und YACs ist.
5. Verfahren gemäß Anspruch 5, gekennzeichnet dadurch das die Anreicherung des Markerabschnittes des  $\alpha$ sl-Kaseingens mittels Polymerase-Kettenreaktion erfolgt.
- 30 6. Verfahren gemäß Anspruch 5, gekennzeichnet dadurch das die Anreicherung des Markerabschnittes des  $\alpha$ sl-Kaseingens in der Polymerase-Kettenreaktion mit den Oligonukleotiden

An.127/Pr

Primer 1 CSN1S1pro1f (5' GAA TGA ATG AAC TAG TTA CC 3')

Primer 2 CSN1S1pro1r (5' GAA GAA GCA GCA AGC TGG 3')

Primer 3 CSN1S1pro2r (5' CCT TGA AAT ATT CTA CCA G 3')

als Primer erfolgt, wobei die Kombination Primer 1 mit  
5 Primer 2 und Primer 2 mit Primer 3 gewählt werden.

7. Verfahren gemäß Anspruch 5, gekennzeichnet dadurch das  
die Bestimmung des allelischen Zustands mittels SSCP,  
RFLP, OLA, TGGE, ASPCR, PCR-ELISA, Microarray-verfahren  
oder durch Nukleinsäuresequenzierung erfolgt.

10 8. Verfahren gemäß Anspruch 5, gekennzeichnet dadurch das  
einer oder mehrere der allelischen Zustände der Marker-  
sequenz des  $\alpha$ s1-Kaseingens nachgewiesen werden

9. Verwendung des Verfahrens gemäß der vorangegangenen An-  
sprüche zur alters- und laktationsunabhängigen Untersu-  
15 chung von Tieren auf Milchleistungsmerkmale.

10. Verwendung des Verfahrens gemäß der vorangegangenen  
Ansprüche zur Auswahl von Organismen, die eine bestimmte  
allelische Form oder einen bestimmten Genotyp der Mar-  
kersequenz des  $\alpha$ s1-Kaseingens oder eines Teilbereiches  
20 dorer tragen.

11. Verwendung des Verfahrens gemäß der vorangegangenen  
Ansprüche in Zuchtprogrammen, insbesondere zur markerge-  
stützten Selektion.

12. Verwendung des Verfahrens gemäß der vorangegangenen  
Ansprüche zur Selektion auf erhöhte Milchproteingehalte.  
25

13. Verwendung eines Markers gemäß Anspruch 1 zur Genom-  
analyse, insbesondere zur Genkartierung und/oder Kopp-  
lungsanalyse.

14. Verwendung eines Markers gemäß Anspruch 1 zur Erzeu-  
30 gung von Expressionsvektoren.

15. Verwendung eines Markers gemäß Anspruch 1 zur Herstel-  
lung transgener Tiere.

An.12//Pri.

16. Testkit, enthaltend Oligonukleotide zur Anreicherung eines Teilbereiches der Markersequenz des  $\alpha$ 1-Kaseingens, vorzugsweise die Primer 1 CSN1S1pro1f (5' GAA TGA ATG AAC TAG TTA CC 3'), Primer 2 CSN1S1pro1r (5' GAA GAA GCA GCA AGC TGG 3') und Primer 3 CSN1S1pro2r (5' CCT TGA AAT ATT CTA CCA G 3') sowie Referenzproben für eine oder mehrere Sequenzen der Markersequenz des  $\alpha$ 1-Kaseingens und dessen Allele enthält.

10

An.127/Pri

Anzahl Abbildungen: 4

## Abbildung 1

1                    gaatgaab: gaactagttaccacaaatag tacacccaaa algaacaaaa  
 49    aatagcttgg tggatataatt aaaatgccac caaaatttat acataatta ttttttcttt  
 5    109    ttgcaggaaa aagattagac cacalataat gtaacttatt tcacaaggta aataatlata  
 169    ataaataata tggattaact gagttttaa aggtgaaata aataalqaat tcttctcatg  
 229    qtcttqtatg ttaataaaaa ttgaaaaatt ttgaaqacc cattttgtcc caagaatttc  
 289    atttacaggt attgaatttt tcaaaggta caaagguaat tttattgata taalaaatgc  
 349    algttelcat aalaaccala aatctagggt tttgttgggg ltttttttg tttgttaatl  
 10    409    tagaacaatg ccattccall lctgtataa tgagtcactt cltltgttga aactctcctt  
 469    agaatthctt gggagaggaa clgaacagaa cattgatttc ctatglgaga gaattcttag  
 529    aatttaataa aacctgttgg ttaactgaa accacaaaat tagcatttta ctaatcagta  
 589    qgtttaaata gcttggagc aaaagtctgc ▼ catcacellq atcatcaaco cagcttgcgt  
 649    ctcttccca gtcttgggt caaggtatta ngtatacala laacaaaatt tctatgatt  
 15    709    tctctgtct catcttcat tcttactaa tacgcagttg taactttct atgtgattgc  
 769    aagtattggt actttctat gelatactgt tagcttaaaa atctcttgc aaatgttgat  
 829    actatctatc tcagagctat aggtgaaau ttaaataact ttataaagac caaattgac  
 889    allltlaaac gaaattotta tatactgaaa alglagatac ataacttcag lalagattta  
 949    tggtaaaata atttgaalca tttttgtcaa attctgtaaa aagltgtcat acagaalaal  
 20    1009    ttataatatt tttgttttca tagaaataac atttctggtg gaattttca agg "1061

▼markiert den Beginn des Exon 1

An.127/Pri

## Abbildung 2

**Sequenzalignment der 4 Allele**  
Variationen in Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen durch Kasten markiert

	10	20	30	40	50	
Allele_1	1 GAATCAATGA	ACTAGTTACC	ACAACTAGTA	CACCCAAAAT	GAACAAAAAA	50
Allele_2	1 GAATCAATGA	ACTAGTTACC	ACAACTAGTA	CACCCAAAAT	GAACAAAAAA	50
Allele_3	1 GAATCAATGA	ACTAGTTACC	ACAACTAGTA	CACCCAAAAT	GAACAAAAAA	50
Allele_4	1 GAATCAATGA	ACTAGTTACC	ACAACTAGTA	CACCCAAAAT	GAACAAAAAA	50
	60	70	80	90	100	
Allele_1	51 TAGCTTGGTG	GTATAATTAA	AATGCCACCA	AAGTTTATAC	AATAATTGTA	100
Allele_2	51 TAGCTTGGTG	GTATAATTAA	AATGCCACCA	AAGTTTATAC	AATAATTGTA	100
Allele_3	51 TAGCTTGGTG	GTATAATTAA	AATGCCACCA	AAGTTTATAC	AATAATTGTA	100
Allele_4	51 TAGCTTGGTG	GTATAATTAA	AATGCCACCA	AAGTTTATAC	AATAATTGTA	100
	110	120	130	140	150	
Allele_1	101 TTTTCTTTT	GCAGGAAAAA	GATTAGACCA	CATATAATGT	AACCTATTTC	150
Allele_2	101 TTTTCTTTT	GCAGGAAAAA	GATTAGACCA	CATATAATGT	AACCTATTTC	150
Allele_3	101 TTTTCTTTT	GCAGGAAAAA	GATTAGACCA	CATATAATGT	AACCTATTTC	150
Allele_4	101 TTTTCTTTT	GCAGGAAAAA	GATTAGACCA	CATATAATGT	AACCTATTTC	150
	160	170	180	190	200	
Allele_1	151 ACAAGGTAAA	TAATTATAAT	AAATAATATG	GATTAACTGA	GTTTTAAAG	200
Allele_2	151 ACAAGGTAAA	TAATTATAAT	AAATAATATG	GATTAACTGA	GTTTTAAAG	200
Allele_3	151 ACAAGGTAAA	TAATTATAAT	AAATAATATG	GATTAACTGA	GTTTTAAAG	200
Allele_4	151 ACAAGGTAAA	TAATTATAAT	AAATAATATG	GATTAACTGA	GTTTTAAAG	200
	210	220	230	240	250	
Allele_1	201 GTGAAATAAA	TAATGAATTC	TTCTCATCGT	CTTGATGTT	ATAAAAAATT	250
Allele_2	201 GTGAAATAAA	TAATGAATTC	TTCTCATCGT	CTTGATGTT	ATAAAAAATT	250
Allele_3	201 GTGAAATAAA	TAATGAATTC	TTCTCATCGT	CTTGATGTT	ATAAAAAATT	250
Allele_4	201 GTGAAATAAA	TAATGAATTC	TTCTCATCGT	CTTGATGTT	ATAAAAAATT	250
	260	270	280	290	300	
Allele_1	251 GAAAAATTTT	GAAGACCCCA	TTTGTGCCA	AGAATTTCC	TTACAGGTAT	300
Allele_2	251 GAAAAATTTT	GAAGACCCCA	TTTGTGCCA	AGAATTTCC	TTACAGGTAT	300
Allele_3	251 GAAAAATTTT	GAAGACCCCA	TTTGTGCCA	AGAATTTCC	TTACAGGTAT	300
Allele_4	251 GAAAAATTTT	GAAGACCCCA	TTTGTGCCA	AGAATTTCC	TTACAGGTAT	300
	310	320	330	340	350	
Allele_1	301 TGAATTTTTC	AAAGGTTACA	AAGGAAATTT	TATTGATATA	ATAAATGCAT	350
Allele_2	301 TGAATTTTTC	AAAGGTTACA	AAGGAAATTT	TATTGATATA	ATAAATGCAT	350
Allele_3	301 TGAATTTTTC	AAAGGTTACA	AAGGAAATTT	TATTGATATA	ATAAATGCAT	350
Allele_4	301 TGAATTTTTC	AAAGGTTACA	AAGGAAATTT	TATTGATATA	ATAAATGCAT	350
	360	370	380	390	400	
Allele_1	351 GTTCTCATAA	TAACCATAAA	TCTAGGGTTT	TGTTGGGGTT	TTTT--GTTT	400
Allele_2	351 GTTCTCATAA	TAACCATAAA	TCTAGGGTTT	TGTTGGGGTT	TTTTTTGTTT	400
Allele_3	351 GTTCTCATAA	TAACCATAAA	TCTAGGGTTT	TGTTGGGGTT	TTTTTT--	400
Allele_4	351 GTTCTCATAA	TAACCATAAA	TCTAGGGTTT	TGTTGGGGTT	TTTTTT--	400
	410	420	430	440	450	
Allele_1	401 GTTAATTTA	GAACAATGCC	ATTCCATTTC	CTGTATAATG	AGTCGCTTCTT	450
Allele_2	401 GTTAATTTA	GAACAATGCC	ATTCCATTTC	CTGTATAATG	AGTCGCTTCTT	450
Allele_3	401 GTTAATTTA	GAACAATGCC	ATTCCATTTC	CTGTATAATG	AGTCGCTTCTT	450
Allele_4	401 GTTAATTTA	GAACAATGCC	ATTCCATTTC	CTGTATAATG	AGTCGCTTCTT	450
	460	470	480	490	500	
Allele_1	451 TCTTGTA	CTCTCCTTAG	AATTTCTTGG	GAGAGGAACT	GAACAGAACAT	500
Allele_2	451 TCTTGTA	CTCTCCTTAG	AATTTCTTGG	GAGAGGAACT	GAACAGAACAT	500
Allele_3	451 TCTTGTA	CTCTCCTTAG	AATTTCTTGG	GAGAGGAACT	GAACAGAACAT	500
Allele_4	451 TCTTGTA	CTCTCCTTAG	AATTTCTTGG	GAGAGGAACT	GAACAGAACAT	500

ARF1

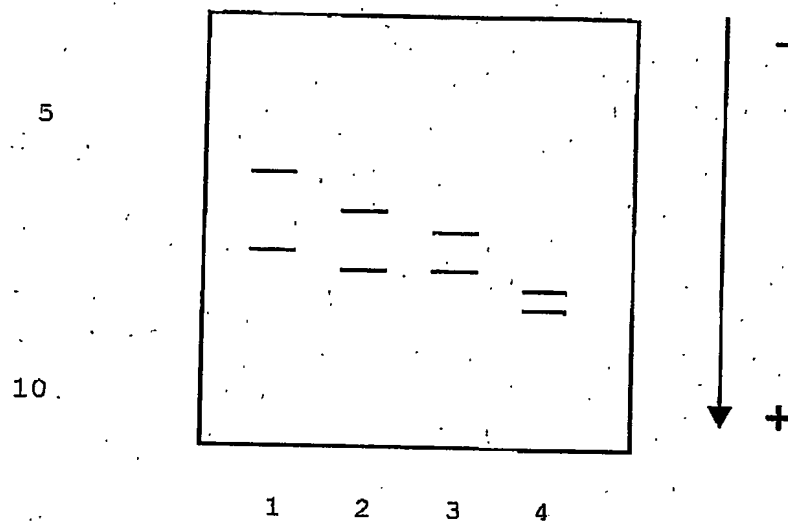
An.127/Prj

		510	520	530	540	550	
	Allel_1	501	TGATTTCCT	ATGTGAGAGA	ATTCTTAGAA	TTTAAATAAA	CCTATTGGTTA
	Allel_2	501	TGATTTCCT	ATGTGAGAGA	ATTCTTAGAA	TTTAAATAAA	CCTGTTGGTTA
	Allel_3	501	TGATTTCCT	ATGTGAGAGA	ATTCTTAGAA	TTTAAATAAA	CCTGTTGGTTA
5	Allel_4	501	TGATTTCCT	ATGTGAGAGA	ATTCTTAGAA	TTTAAATAAA	CCTGTTGGTTA
		560	570	580	590	600	
	Allel_1	551	AACTGAAAC	CACAAAATTA	GCATTTTACT	AATCAGTAGG	TTTAAATAGCT
	Allel_2	551	AACTGAAAC	CACAAAATTA	GCATTTTACT	AATCAGTAGG	TTTAAATAGCT
10	Allel_3	551	AACTGAAAC	CACAAAATTA	GCATTTTACT	AATCAGTAGG	TTTAAATAGCT
	Allel_4	551	AACTGAAAC	CACAAAATTA	GCATTTTACT	AATCAGTAGG	TTTAAATAGCT
		610	620	630	640	650	
	Allel_1	601	TGGAAGCAA	AAGTCTGCCA	TCACCTTGAT	CATCAACCCA	GCTTGCTGCTT
	Allel_2	601	TGGAAGCAA	AAGTCTGCCA	TCACCTTGAT	CATCAACCCA	GCTTGCTGCTT
	Allel_3	601	TGGAAGCAA	AAGTCTGCCA	TCACCTTGAT	CATCAACCCA	GCTTGCTGCTT
15	Allel_4	601	TGGAAGCAA	AAGTCTGCCA	TCACCTTGAT	CATCAACCCA	GCTTGCTGCTT
		660	670	680	690	700	
	Allel_1	651	TCTT				
	Allel_2	651	TCTT				
	Allel_3	651	TCTT				
	Allel_4	651	TCTT				

25

An.127/Pri

Abbildung 3



An.127/Pri

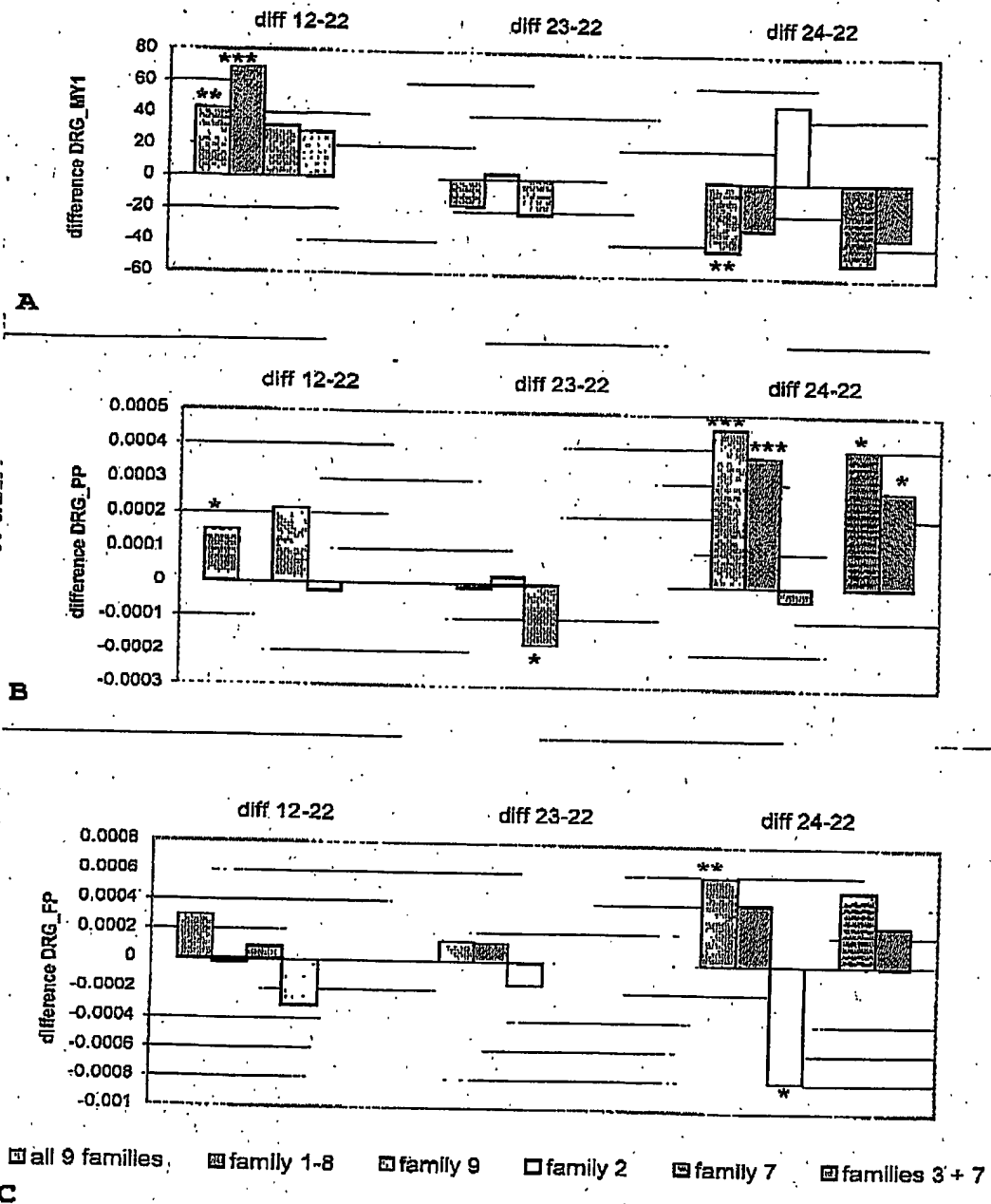


Abbildung 4

An.127/Pri